

细胞生长速率对青霉素酰化酶基因表达的影响

蒋巧玲¹ 吴汝平² 杨胜利¹

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)¹

(中国科学院上海药物研究所, 上海)²

本文报道在细胞生长的不同时期,加苯乙酸诱导pac基因表达,发现在细胞生长早期(0—24h),苯乙酸诱导pac基因表达的效应非常明显,诱导效率很高;随着时间的推移,苯乙酸诱导pac基因表达的作用逐渐减弱,在细胞生长中期(24—48h),诱导效率明显减弱;在细胞生长后期即静止期(48—72h),苯乙酸几乎诱导不出pac基因的表达。RNA-DNA点杂交检测各期细胞内青霉素酰化酶mRNA的量,也发现在生长早期诱导的细胞转录产生的pac-mRNA量很高,在生长中、后期诱导的细胞转录产生的pac-mRNA量明显减少,mRNA水平和蛋白质水平变化趋势一致。上述结果表明,苯乙酸诱导青霉素酰化酶基因表达依赖于细胞生长速率,处于生长周期不同时期的细胞,诱导产生青霉素酰化酶的能力不同,细胞生长速率对pac基因表达的影响发生在转录水平,pac基因表达与细胞生长相偶联,提示存在一个或多个与细胞生长相偶联的因子调节着pac基因的表达。

关键词 青霉素酰化酶; 细胞生长; 基因表达

大肠杆菌合成青霉素G酰化酶不仅受苯乙酸诱导^[1],而且受温度调控,在温度位移实验中发现,带青霉素酰化酶基因(pac)的大肠杆菌,在37℃培养16h后位移至22℃继续培养,则大肠杆菌不再继续增殖,也不能恢复表达青霉素酰化酶的能力,而在37℃培养的种子细胞,接种到22℃培养却能正常生长和产生青霉素酰化酶^[2]。实验还发现,葡萄糖对青霉素酰化酶基因表达的抑制作用是通过降低pH,影响大肠杆菌正常生长引起的,当恒定pH后大肠杆菌生长正常,葡萄糖对青霉素酰化酶基因表达也就没有抑制作用。这些现象提示青霉素酰化酶基因表达与细胞生长密切相关。

本文报道大肠杆菌表达青霉素酰化酶基因依赖于细胞生长速率,只有新生的细胞才具有产生青霉素酰化酶的潜能,细胞生长在转录水平影响pac基因表达。

材料与 方法

(一) 菌种

大肠杆菌 D816 是青霉素酰化酶产生菌,由上海第三制药厂赠送。

(二) 试剂

³²P- α -dATP为Amersham产品。

(三) 培养基和培养条件

培养基:3%酵母浸膏干粉,0.5% NaCl,0.2%苯乙酸,pH7.8—8.0。

培养条件:250ml三角烧瓶装150ml培养基,在旋转式摇床上培养,摇床转速为180—200 r/min。

(四) 青霉素酰化酶活性测定

用3-苯乙酰胺-6-硝基苯甲酸(NIPAB)为底物测定青霉素酰化酶活性,方法参照文献[3]。

(五) RNA提取

用异硫氰酸胍一步法提取RNA^[4]。大肠杆菌培养30—38h后,离心收集菌体,分别用异硫氰酸胍-酚-氯仿破壁去蛋白和DNA杂质,用乙醇沉淀,置-20℃保存。

(六) DNA探针制备

本文于1991年4月24日收到。

所需 DNA 片段用合适的酶从质粒上切出后, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DEAE81 滤纸回收, Cellulose 小柱纯化所需 DNA 片段。所得 DNA 片段用缺口转移法进行标记^[5]。

(七) RNA-DNA 点杂交

RNA-DNA 点杂交参照 Casey 法^[6]。RNA 样品用 $3 \times \text{SSC}$, 7% 甲醛溶解, 在 $50-55^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 min 变性, 点样于 Zeta-probe 滤膜上, 80°C 烘 2h。 42°C 条件下用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 洗 3 次, 预杂交 2-4h。加入标记好的探针, 42°C 杂交 24-48h。 65°C 条件下分别用大量的 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 和 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 洗 3 次, 晾干杂交膜, 放射自显影 24-48h。

结 果

(一) 大肠杆菌 D816 的生长曲线

大肠杆菌 D816 接种 2% 过夜培养的种子, 在 22°C 培养 96h, 每 24h 测其细胞密度。发现加诱导剂和不加诱导剂两种条件下, 大肠杆菌 D816 的生长曲线基本一致, 都经历细胞生长早期、生长中期和静止期 3 个时相。0-24h 为细胞生长早期, 此期细胞分裂繁殖非常迅速; 24-48h 为细胞生长中期, 此期细胞分裂繁殖速率减慢, 由对数生长期过渡到静止期; 48-96h 为细胞生长静止期, 此期细胞生长和死亡达平衡状态。大肠杆菌 D816 在 22°C 培养的生长曲线如图 1 所示。

(二) 各期细胞表达青霉素酰化酶的潜能不同

22°C 培养的大肠杆菌 D816 分成 8 组, 分别在发酵开始后的 0、12、24、36、48、60、72 h 加入诱导剂, 不加诱导剂作为对照组, 在发酵至 24、48、72、96 h 时用 NIPAB 法测定青霉素酰化酶活性, 结果

见图 1 所示。在细胞生长的早期 (0-24h), 苯乙酸诱导产生青霉素酰化酶的效率很高, 图中曲线的斜率显示了这一点, 并且细胞内合成的青霉素酰化酶也最高; 随着时间的推延, 在细胞生长中期 (24-48h), 苯乙酸诱导青霉素酰化酶基因表达的作用逐渐减弱, 此时细胞内积累的青霉素酰化酶也降低; 在细胞生长静止期, (48-96h), 几乎诱导不出青霉素酰化酶基因的表达, 此时加诱导剂产生的青霉素酰化酶与对照组的差别不大, 如图 1 所示。

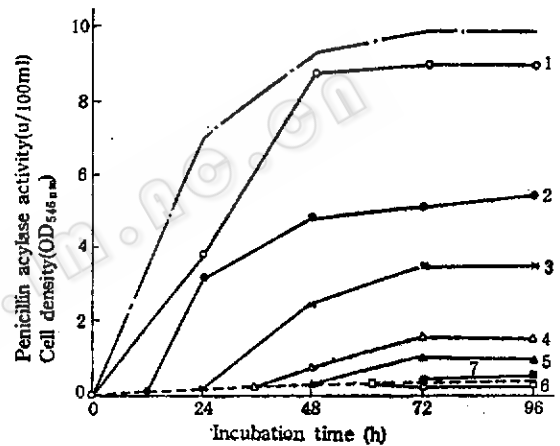


图 1 诱导时间对青霉素酰化酶基因表达的影响
Fig.1 Effect of the induction time on the pac gene expression

---, Cell density

.....: Activity of penicillin acylase, without induction

——: Activity of penicillin acylase, with induction at different times

1-7 curve represents induction time (0, 12, 24, 36, 48, 64, 72, respectively)

进一步测定了细胞生长速率与青霉素酰化酶合成的关系, 在 0h 加入苯乙酸诱导 pac 基因表达, 然后在不同时间测定细胞密度和青霉素酰化酶活力, 结果如表 1 所示。结果表明在 0-24h, 细胞增殖最快, 单位细胞合成青霉素酰化酶的速率最快, 但单位体积合成青霉素酰化酶的量在 24-48h 增加最快, 这是由于单位体积中

表 1 生长速率对 pac 基因表达的影响

Table 1 Effect of growth rate on the pac gene expression

Time (h)	Growth rate (10^8 cells/h·ml)	Synthetic rate of penicillin acylase	
		(10^{-4} u/h·ml)	(10^{-4} u/h· 10^9 cells)
0—24	2.91	16.80	5.00
24—48	1.04	30.46	3.61
48—72	0.21	9.46	1.00
72—96	0.00	1.05	0.11

细胞数的差异引起的。青霉素酰化酶不是大肠杆菌生命活动所必需的, 其生理功能也不清楚, 它的表达与细胞生长偶联的机制可能与生长必需基因不同。因此我们进一步用核酸杂交分析在不同诱导条件下, 青霉素酰化酶 mRNA 的量, 以测定宿主细胞的生长速率对青霉素酰化酶基因转录的影响。

(三) 细胞生长速率在转录水平影响 pac 基因表达

大肠杆菌 D816 在 22°C 培养, 分别在生长早期 (0、12h) 中期 (24h) 和后期 (48h) 加入 0.2% 苯乙酸, 诱导青霉素酰化酶基因表达。各组在加诱导剂后继续培养 12h, 离心取等量菌体, 提取细胞总 RNA。用质粒 pPA₁ Hind III - Bgl II 1.65kb 青霉素酰化酶基因部分片段作为探针, 分析各组细胞内青霉素酰化酶 mRNA 量。放射自显影结果见图 2 所示。细胞在生长早期 (0、12h) 诱导 pac 基因转录的效率很高, 此时细胞内 pac-mRNA 含量最高; 在细胞生长中期 (24h) 诱导产生的 pac-mRNA 量有所减少; 在生长后期 (48h) 诱导产生的 pac-mRNA 量则明显减少。12h 诱导的细胞内青霉素酰化酶 mRNA 量约为 24h 诱导的 3 倍, 为 48h 诱导的 5 倍, 如图 3 所示。图 2、图 3 表示的青霉素酰化酶 mRNA 的转录效率, 与图 1 所示曲线斜率代表的青霉素酰化酶合成效率完全一致, 再次表明

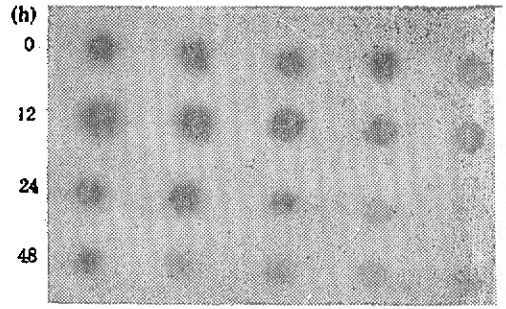


图 2 诱导时间对 pac 基因转录的影响
Fig.2 Effect of the induction time on the transcription of the pac gene probe: Hind III - Bgl II fragment of the pac gene

处于生长周期不同时相的细胞, 诱导产生青霉素酰化酶的能力不同, pac 基因表达与细胞生长相偶联, 细胞生长速率对 pac 基因表达的影响发生在转录水平。

在 24、48、72、96h 测定青霉素酰化酶活性, 0 h 诱导的细胞合成的青霉素酰化酶总是高于 12h 诱导的细胞 (如图 1 所示青霉素酰化酶的绝对值), 而在加诱导剂

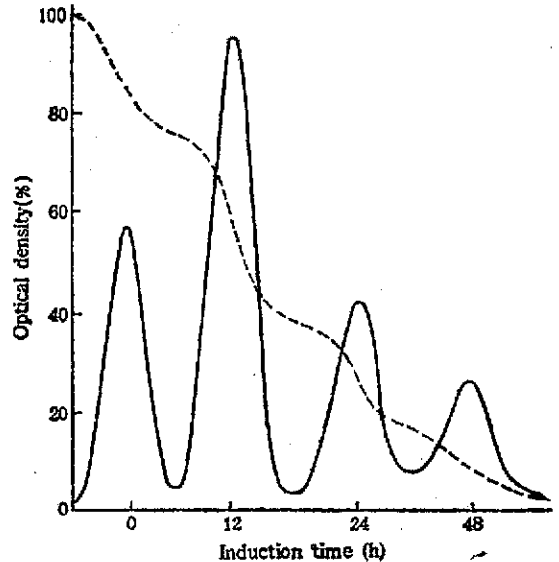


图 3 诱导时间对 pac mRNA 浓度的影响
Fig.3 Effect of induction time on the concentrations of pac mRNA

—: Optical density
---: Integral curve

后的12h内,12h 诱导的细胞合成青霉素酰化酶的效率却高于0h诱导的细胞,如图1曲线的斜率和图2、图3所示。这是因为在0—12h期间内,细胞经历了短暂的潜伏期,随后进入对数生长期,随着细胞的继续增殖,在生长后期,新生的细胞逐渐减少,诱导产生青霉素酰化酶的效率也就随之降低。所以在诱导后12h内,12h 诱导的细胞中青霉素酰化酶 mRNA 浓度最高。

讨 论

细胞生长可以通过转录水平^[7-9]、转录后水平^[10]和翻译后加工水平^[11,12]影响基因表达,目前已发现一些顺式和反式作用的因子参与细胞生长对基因表达的调控^[13]。青霉素酰化酶基因的诱导表达依赖于细胞生长,其作用发生在转录水平。正因为只有生长早期的细胞才具有表达青霉素酰化酶的潜能,所以在37℃培养16h的细胞位移至22℃继续培养仍不能产生青霉素酰化酶,使得温度的抑制作用表现为不可逆性。

基因表达和细胞生长的关系极为复杂,目前已发现一些基因表达与细胞生长

有关^[14],但要判别是细胞生长调节基因表达,还是基因表达调节细胞生长进程,却是相当困难的问题,对基因表达和细胞生长,究竟何者为原发始动因素,迄今很难判断。青霉素酰化酶基因在细胞生长进程中表达强弱不一,表现为 pac 基因表达依赖于细胞生长。

在研究温度对青霉素酰化酶基因表达的影响时,我们发现在37℃培养的细胞在16h后位移到22℃培养,细胞不再增殖,也不产生青霉素酰化酶^[12]。这是由于青霉素酰化酶基因表达与细胞生长偶联,可能有一个温度敏感的因子参与两者的调控或偶联。

青霉素酰化酶基因表达的调控较一般的原核基因复杂,它不仅具有原核基因中极为少见的翻译后加工^[6,15],而且还涉及细胞生长。由此提示存在一个或多个与细胞生长相偶联的因子,调节着青霉素酰化酶基因的表达,这些生长偶联因子可能是温度敏感的。因此研究青霉素酰化酶基因调控,就不能局限于操纵子水平的研究,而同时要考虑它的表达与细胞基因调节网络的关系。

参 考 文 献

- [1] 杨胜利等,生物工程学报,1(1):29,1985.
- [2] 杨胜利等,生物工程学报,4(1):32,1988.
- [3] 张启先等,微生物学报,19:302,1979.
- [4] Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Analytical Biochem.*, 162:156, 1987.
- [5] Rigby, P.N.J. et al., *J. Mol. Biol.*, 113:237, 1977.
- [6] Casey, J. and Davidson, N., *Nucleic Acids Res.*, 4:1539, 1977.
- [7] Kim, Y.K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:16, 1988.
- [8] Kim, Y.K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:5894, 1988.
- [9] Andrews, B.J. et al., *Cell*, 57:21, 1989.
- [10] Hereford, L.M. et al., *Cell*, 24:367, 1981.
- [11] Wittenberg, C. et al., *Cell*, 54:1061, 1988.
- [12] Draetta, G. et al., *Cell*, 54:17, 1988.
- [13] Breeden, L. et al., *Cell*, 48:389, 1987.
- [14] Renato Baserga, *The Biology of Cell Reproduction*, Harvard University Press, pp.158, 1984.
- [15] Schumacher, G. et al., *Nucleic Acids Res.*, 14:5713, 1986.
- [16] Oh, S.J. et al., *Gene*, 56:87, 1987.

Relationship Between *pac* Gene Expression and Cell Growth Rate

Jiang Qiaoling¹ Wu Ruping² Yang Shengli¹

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences)¹

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences)²

The induction of the *pac* gene expression by phenylacetic acid at different times showed that the induction effect depended on the cell growth rate. The induction was efficient at early exponential phase and became weaker at middle and late exponential phase. At stationary phase, the *pac* gene expression could not be induced at all. The *pac* gene expression was related to the cell growth rate. The results of RNA-DNA hybridization showed that cell growth rate regulated the *pac* gene expression at the transcriptional level. It was suggested that some regulatory factors, which were related to cell growth, were involved in the expression of *pac* gene and at least one of them was temperature sensitive.

Key words

Penicillin acylase; cell growth; gene expression